



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 1/21, A61K 38/17		A1	(11) 国際公開番号 WO96/23069
			(43) 国際公開日 1996年8月1日(01.08.96)

(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00134 (22) 国際出願日 1996年1月25日(25.01.96) (30) 優先権データ 特願平7/10085 1995年1月25日(25.01.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ベッセルリサーチ・ラボラトリー (VESSEL RESEARCH LABORATORY CO., LTD.)[JP/JP] 〒194 東京都町田市旭町三丁目6番6号 Tokyo, (JP) (71) 出願人 (米国と日本を除くすべての指定国について) 大阪府(OSAKA PREFECTURAL GOVERNMENT)[JP/JP] 〒540 大阪府大阪市中央区大手前二丁目1番22号 Osaka, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 長谷川一英(HASEGAWA, Kazuhide)[JP/JP] 〒194 東京都町田市旭町三丁目6番6号 Tokyo, (JP) 荒川絵美(ARAKAWA, Emi)[JP/JP] 〒194 東京都町田市中町四丁目3番18号 Tokyo, (JP) 小田祥二(ODA, Shoji)[JP/JP] 〒227 神奈川県横浜市青葉区桂台一丁目17番30号 Kanagawa, (JP)	松田 謙(MATSUDA, Yuzuru)[JP/JP] 〒184 東京都小金井市黄井南町一丁目22番7号 Tokyo, (JP) 高橋克仁(TAKAHASHI, Katsuhito)[JP/JP] 〒563 大阪府池田市鉢塚三丁目9番25-506号 Osaka, (JP) 菅原理裕(SUGAWARA, Michihiro)[JP/JP] 〒418 静岡県富士宮市三園平1661 Shizuoka, (JP) 石山晴生(ISHIYAMA, Haruo)[JP/JP] 〒259-01 神奈川県中部二宮町中里891-1 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yasuko et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 虎ノ門中田ビル2F Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, FI, HU, JP, KR, NO, NZ, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) Title : RECOMBINANT DNA PREPARED BY INTEGRATING DNA THAT CODES FOR MYOSIN HEAVY-CHAIN SM1 ISOFORM PROTEIN INTO VECTOR DNA, AND MICROORGANISM AND ARTERIOSCLEROSIS REMEDY BOTH CONTAINING THE RECOMBINANT DNA

(54) 発明の名称 ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNA並びに該組換え体DNAを含有する微生物及び動脈硬化治療剤

Category	Sub-category	Degree of intimal thickening (a)	β-Galactosidase gene transfer (b)	SM1 gene transfer (c)
b (比較例)	β-Galactosidase gene transfer (b)	~0.65	~0.55	~0.58
	SM1 gene transfer (c)	~0.38	~0.22	~0.32

a ... Degree of intimal thickening
b ... β-Galactosidase gene transfer (Comp. Ex.)
c ... SM1 gene transfer (Ex.)

(57) Abstract

A recombinant DNA prepared by integrating a DNA that codes for a smooth-muscle myosin heavy-chain SM1 isoform protein into a vector DNA; and a microorganism and arteriosclerosis remedy both containing the recombinant DNA. The DNA is utilizable as a gene remedy for post-PTCA reconstruction.

(57) 要約

本発明は、平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNA並びに該組換え体DNAを含有する微生物及び動脈硬化治療剤に関する。本発明の組換え体DNAはPTCA処置後の再狭窄に対する遺伝子治療剤として有効に用いることができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LR	セントラリア	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LV	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LU	ラトヴィア	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	ス威士ランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド		マダガスカル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CU	キューバ	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン				

明 細 書

ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNA並びに該組換え体DNAを含有する微生物及び動脈硬化治療剤

技術分野

本発明は、遺伝子治療に用いるミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNA並びに該組換え体DNAを含有する微生物及び動脈硬化治療剤に関する。

背景技術

平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質は平滑筋細胞で特異的に発現しているミオシン重鎖アイソフォームタンパク質の一つで、平滑筋の収縮弛緩を担うタンパク質である。該タンパク質のDNAとしては、ウサギSM1アイソフォームのcDNAの塩基配列が知られている【ビー・バビジ(P. Babij)ら：プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 88, 10676 (1991)】が、それらのDNAの間の塩基配列の相同性は知られていない。また、動物細胞へ注入できる平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質のDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAは知られていない。

平滑筋細胞に存在するカルボニンと呼ばれるタンパク質のcDNAをラット肺動脈由来血管平滑筋細胞株に導入して発現したところ、細胞の倍增時間が約4時間長くなること【高橋ら：サーキュレーション(Circulation), 88, I-174 (1993)】、ウサギの頸動脈をバルーン擦過した部位にヒトカルボニンのcDNAを局所注入すると内膜肥厚が抑制されること【高橋ら：Circulation, 88, I-656 (1993)】が報告されているが、ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質のDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAが薬理効果を持つこと、遺伝子治療に用いられることは全く知られていない。

動脈硬化症の治療として、バルーンカテーテルで狭窄部位を広げる経皮的冠動

脈形成術（PTCA）が盛んに行われている。該治療法はバイパス手術などに比べて容易に行うことができ、成功率も高いという利点を持つ反面、治療を行った患者の30～40%に血管細胞の異常増殖により、再び血管が塞がってしまう再狭窄を起こすという欠点がある。そのため、該再狭窄を防ぐために有用な動脈硬化治療剤の開発が望まれている。

発明の開示

本発明は、以下の発明を包含する。

（1）平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNA。

（2）ベクターDNAがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又は発現動物用プラスミドである前記（1）に記載の組換え体DNA。

（3）発現動物用プラスミドがpCXN2又はPAGE208である前記（2）に記載の組換え体DNA。

（4）平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質がヒト平滑筋型、ウサギ平滑筋型又はマウス平滑筋型である前記（1）～（3）のいずれかに記載の組換え体DNA。

（5）平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAが配列番号1記載の塩基配列又は該塩基配列において1又は複数の塩基が付加、欠失又は置換されている前記（1）～（3）のいずれかに記載の組換え体DNA。

（6）平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAであって、配列番号1記載の塩基配列からなるDNA又は該塩基配列において1もしくは複数の塩基が付加、欠失もしくは置換されているDNA。

（7）前記（5）に記載の組換え体DNAを保持する微生物。

（8）エシェリヒア属に属する前記（7）に記載の微生物。

（9）前記（1）～（5）のいずれかに記載の組換え体DNAを含有する動脈硬化治療剤。

平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAとしては、平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするcDNA又はゲノム型DNAがあげられ、好ましくはヒト、ウサギ、マウス等のDNAがあげられる。

平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAの塩基配列としては、ウサギSM1アイソフォームタンパク質のcDNA [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10676 (1991)]、配列番号1で示されるマウスミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAの塩基配列又はこれらの塩基配列の相同部で特定した配列番号2で示される塩基配列〔なお配列中、YはT、U又はCを表し、SはG又はCを表し、VはA、G又はCを表し、BはG、C、T又はUを表し、WはA、T又はUを表し、NはA、C、G、TもしくはU又は単結合を表す。また、コドンYAS (388-390) はTAC又はCAGを表す。〕があげられる。従って、配列番号2で示される塩基配列は、配列番号1で示される塩基配列及びウサギSM1アイソフォームタンパク質のcDNAの塩基配列を含む。また、ヒト平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質のcDNA部分塩基配列が知られているが〔アメリカン・ジャーナル・オブ・メディカル・ジェネティクス (Amer. J. of Medical Genetics), 46, 61-67 (1993)]、該DNA部分配列と配列番号2で示される塩基配列の部分配列とを組み合わせた塩基配列も、本発明における平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAの塩基配列に含まれる。

更に、部位特定変異誘発〔ヌクレイック・アシド・リサーチ (Nucleic Acid Research), 10, 6487-6508 (1982)] により、配列番号2で示される塩基配列又は配列番号2で示される塩基配列の部分配列とヒト平滑筋由来のDNAの塩基配列とを組み合わせた塩基配列において、1又は複数の塩基が付加、欠失又は置換された場合も、本発明における平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAの塩基配列に含まれる。

ベクターDNAとしては、ウイルスベクターとしてレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又は発現動物用プラスミ

ドである p C X N 2 [ジーン (Gene), 108, 193-200 (1991)]、P A G E 2 0 7 (特開平 6 - 4 6 8 4 1 号公報) 又はその改変体等を用いることができる。

本発明の動脈硬化治療剤は、活性成分である平滑筋型ミオシン重鎖 SM 1 アイソフォームタンパク質をコードする DNA をベクター DNA に組み込んだ組換え体 DNA を、遺伝子治療剤に用いる基剤と共に調合して製造することができる。なお、該製剤は投与する直前に、必要によりリボソーム等に封入した後、動脈硬化の遺伝子治療に用いることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 11307 (1993)]。

また、平滑筋型ミオシン重鎖 SM 1 アイソフォームタンパク質をコードする DNA をウイルスベクターに組み込んだ場合は、組換え体 DNA を含有するウイルス粒子を調製し、遺伝子治療剤に用いる基剤と共に調合して治療剤を製造することができる [ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genet.), 8, 42 (1994)]。

遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればどのようなものでもよく、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また、常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH 調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。

前記の動脈硬化治療剤は、遺伝子治療の直前に液体の場合はそのまま、固体の場合は必要により滅菌処理をした前記の基剤に溶解して治療に使用することができる。

本発明の動脈硬化治療剤の投与方法は、PTCA 処置を行った患者に対して、毎日又は術後 1 回の投与で、1 日 1 n g ~ 1 g の用量を、患者の治療部位の血管平滑筋細胞に吸収されるように、カテーテル等を用いて局所的に投与すればよい。

本発明の動脈硬化治療剤は、投与量内で安全である。

以下に、本発明の平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAの製造方法を説明する。

平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAは、以下に述べる一般の遺伝子工学的手法あるいはそれに準じる方法を用いて製造することができる。

子宮、大動脈等の平滑筋が主である組織のcDNAライブラリーからエイ・アベらの方法〔ECLダイレクトDNAラベリング検出システム解説書（アマシャム(Amersham)社）〕により平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAのクローンを検出する。

該DNA断片を適当なベクターDNA中のプロモーターの下流に連結することによりミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質を組み込んだ組換え体DNAを製造することができる〔ジェイ・サンプブルック(J. Sambrook)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、第2版、1巻、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年〕。なお、プロモーターとしては動物細胞を宿主とするため、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、 β アクチンプロモーター等が利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。

以下に、前記組み換え技法における反応の条件を示す。DNAの制限酵素による消化反応は、通常0.1～20 μ gのDNAを2～200mM（好ましくは10～40mM）のTris-HCl(pH6.0～9.5 好ましくはpH7.0～8.0)、0～200mMの塩化ナトリウム、2～20mM（好ましくは5～10mM）の塩化マグネシウムを含む反応液中で、制限酵素0.1～100単位（好ましくは1 μ gのDNAに対して1～3単位）を用い、20～70℃（至適温度は用いる制限酵素により異なる）において、15分間～24時間行う。反応の停止は、通常55～75℃で、5～30分間加熱することによるが、フェノール等の試薬により制限酵素を失活させる方法も用いることができる。制限酵素消化によって生じたDNA断片あるいはギャップト・デュプレックスDNAの精製はPrep-A-Gene Matrix（バイオラッド(BIO-RAD)社）を用いて行う

ことができる。DNA断片の結合反応は、DNAライゲーションキット（宝酒造社）を用いて行うことができる。

このようにして構築された平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAを含有する組換え体DNAを用いて、形質転換体を製造する。

発現動物用プラスミドベクターの宿主としては、エシェリヒア属に属するエシェリヒア・コリのK12・HB101〔エイチ・ダブリュー・ボイヤー（H. W. Boyer）ら：ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（J. Mol. Biol. ），41, 459（1969）〕、DH5 α 〔ディー・ハナハン（D. Hanahan）：J. Mol. Biol., 166, 557（1983）〕等が用いられる。該エシェリヒア属菌の形質転換は、コーエンらの方法〔エス・エヌ・コーエン（S. N. Cohen）ら：Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110（1972）〕に従って行うことができる。

ウイルスベクターの宿主としては、ウイルス生産能を有する動物細胞である、サル細胞COS-7、チャイニーズハムスター細胞CHO、マウス細胞BALB/3T3、ヒト細胞HeLa等が用いられ、レトロウイルスベクターの宿主としては、 Ψ CRE、 Ψ CRIP〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6460（1988）〕、MLV〔ジャーナル・オブ・ヴィロロジー（J. Virol. ），65, 1202（1991）〕等が、アデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターの宿主としては、ヒト胎児腎臓由来の293細胞〔実験医学、12, 316（1994）〕等が用いられる。ウイルスベクターの動物細胞への導入はリン酸カルシウム法〔ヴィロロジー（Virology）, 52, 456（1973）〕等で行うことができる。

得られた形質転換体は、細胞種の違いにより以下のように培養し、組換え体DNAの生産に供することができる。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、可溶性でんぷん、ショ糖、グリセロール等、窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、ペプトン、カゼイン等、無機物としては、例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム等が挙げられ

る。また酵母抽出物、ビタミン類等を添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばTerrific broth (ケイ・ディー・タートフ (K. D. Tartof) ら: ベテスダ・レサーチ・ラボラトリー・フォーカス (Bethesda Res. Lab. Focus), 9, 12 (1987)) が好ましい。培養は通常約15～43℃で約8～24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。培養終了後、バーンボイムの方法 [Nucleic Acid Res., 7, 1513 (1979)] 等により精製することにより、平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAを含有する組換え体DNAを得ることができる。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば約5～20%のウシ胎児血清を含む199培地 [モーガン (Morgan) ら: Proc. Soc. Biol. Med., 73, 1 (1950)]、MEM培地 [エイチ・イーグル (H. Eagle) : サイエンス (Science), 122, 501 (1952)]、DMEM [アール・ダルベッコ (R. Dulbecco) ら: Virology, 8, 396 (1959)] 等が用いられる。pHは約6～8が好ましい。培養は通常約30～40℃で約18～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

組換え体DNAを含有するウイルス粒子は培養上清中に放出されるので、ウイルス粒子の濃縮、精製を塩化セシウム遠心法 [沢田幸治ら、新生化学実験講座2-V, 33 (1992)]、ポリエチレングリコール沈澱法 [アーチーブ・ヴィロロジー (Arch. Virol.), 71, 185 (1982)]、フィルター濃縮法 [ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (J. Cell Biol.), 111, 217 (1990)] 等で行うことにより、平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAを含有する組換え体DNAを得ることができる。

図面の簡単な説明

図1は、マウス平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするcDNAの制限酵素地図及び翻訳領域の位置を示す。

プラスミド名: SM-1 Ftext

プラスミドのサイズ: 6175bp

枠内部：翻訳領域

A : ApaI

B : BamHI

Sa : SacI

Sm : SmaI

図2は、CHO細胞にpSE-SM1-Hygを導入してハイグロマイシンで選択して出現したコロニーとPAGE208を導入して出現したコロニーとの面積比を示す。

図3は、HeLa細胞にpSE-SM1-Hygを導入してハイグロマイシンで選択して出現したコロニーとPAGE208を導入して出現したコロニーとの面積比を示す。

図4は、CHO細胞の野生型、PAGE208導入クローン、SM1アイソフォーム発現クローン(SM1-5-2-1、SM1-5-3-3)の増殖速度のMTT法を用いての比較を示す。

—○— CHO

—△— PAGE208-1

—●— SM1 5-2-1

—■— SM1 5-3-3

図5は、バルーン傷害ウサギモデルの血管壁にSM1遺伝子を導入した例(実施例)と β -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入した例(比較例)における内膜肥厚度を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1) マウス平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNA

(a) プロープの作製

ウサギ平滑筋型ミオシン重鎖SM2アイソフォームタンパク質のcDNA断片

をクローニングしたプラスミドpSMHC29 及びpIH61 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biol. Chem.), 264, 9734-9737(1989)] を使用した。これをEcoRI (宝酒造社製、以下制限酵素に関しては特記しないかぎりすべて宝酒造社製) で切断し、ウサギ平滑筋型ミオシン重鎖SM2アイソフォームタンパク質の挿入用cDNA断片を調製した。これをECLダイレクトDNAラベリングシステム (アマシャム社) を用いて標識し、以下のスクリーニングにおけるプローブとして用いた。

(b) スクリーニング

λ gt11ベクターマウス子宮cDNAライブラリー (クローンテック (CLONTECH) 社製) を大腸菌Y1090 (クローンテック社製) と混ぜ、37℃で15分間インキュベートした後、0.7 %アガロースNZY [Nucleic Acid Res., 16, 7583-7600 (1988)] を加え、1.5 %寒天NZYプレートにまいた。ブランクのできたプレートにナイロンフィルターを置き、フィルターにブランクを転写した。このフィルターをアルカリ処理することによって変性させた後、80℃2時間の加熱によってDNAの固定を行った。(a) において、ECLダイレクトDNAラベリングシステムのプロトコールにしたがって先に標識したプローブと、DNAをハイブリダイズさせた。更にECL検出システム [アマシャム社製] を用いてオートラジオグラフィーを行ってハイブリダイズするクローンを検出した。

(c) DNA塩基配列解析

4個のクローンが同定され、各クローンを配列解析のためにpUC119 (宝酒造社) 又はpBluescript SK(-) (ストラタジーン (STRATAGENE) 社) にサブクローニングした。得られたプラスミドで大腸菌DH5 α を形質転換し、形質転換体エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) DH5 α /pmsmhc20、pmsmhcC5、pmsmhcN08、pmsmhcN14を得た。該形質転換体から産生されたプラスミドを、更にエキソヌクレアーゼ消化によって段階的に削っていき、又は適当な制限酵素によって切断後、自己閉環あるいはサブクローニングし、配列解析のための鋳型DNAを調製した [Gene, 28, 351-359 (1984)]。配列決定には蛍光式DNAシーケンサー (アプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 社) を用い、データ解析にはMacMolly [Soft Gene GmbH社製] を使用した。DNAの塩基配列の結果

を配列番号 1 に示した。また該塩基配列の結果から得たアミノ酸配列の推定結果も配列番号 1 に示した。

(d) マウス平滑筋型ミオシン重鎖 SM1 アイソフォーム発現プラスミドの作製

先に得た 4 個のクローンから SM1 アイソフォーム全翻訳領域をコードする cDNA を含むプラスミド pmSM1 を以下の方法により作製した [ジェイ・サンブルックら、モレキュラー・クローニング、第 2 版、1 巻、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス、1989 年]。まず 5' 非翻訳領域を短くするために、4 個のクローンの一つであるプラスミド pmsmhcN14 を制限酵素 BamHI と BglII で切断し 5 kb の DNA 断片を精製、回収した。この DNA 断片を自己閉環して大腸菌 DH5 α を形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを得た。このコロニーの培養菌体から公知の方法 [エイチ・シー・バーンボイム (H. C. Birnboim) ら : Nucleic Acid Res., 7, 1513 (1979)] に従ってプラスミド DNA を回収した。得られたプラスミドの構造は、BamHI 及び KpnI で切断後、アガロースゲル電気泳動により確認した。このプラスミドを pmsmhcN14' とよぶ。

得られたプラスミド pmsmhcN14' を制限酵素である NsiI (ニューイングランドバイオラブ (New England Biolabs) 社) と EcoRV で切断し、4 kb の DNA 断片を精製、回収した。またプラスミド pmsmhcN08 も NsiI と EcoRV で切断して 1 kb の DNA 断片を精製、回収し、先に得られたプラスミド pmsmhcN14' 由来の 4 kb の DNA 断片と結合させて、pmsmhcN14-08 を構築した。このプラスミドの構造は NsiI 及び EcoRV で切断して確認した。得られた pmsmhcN14-08 を制限酵素 ApaI と KpnI で切断して 5 kb の DNA 断片を精製、回収した。また同様にプラスミド pmsmhc20 も ApaI と KpnI で切断して 1.5 kb の DNA 断片を精製、回収し、先の 5 kb の DNA 断片と結合させて、プラスミド pmsmhcN14-08-20 を構築した。このプラスミドの構造は ApaI 及び KpnI で切断して確認した。

得られた pmsmhcN14-08-20 を制限酵素 ApaI で切断して 6 kb の DNA 断片を精製、回収した。また pmsmhcC5 を ApaI で切断して 2 kb の DNA 断片を精製、回収し、pmsmhcN14-08-20 の 6 kb の DNA 断片と結合させてプラスミド pmsmhcN14-08-5-20 を構築した。このプラスミドの構造は EcoRI 及び NruI で切断して確認した。

プラスミド pmsmhcN14-08-5-20 を制限酵素 NsiI と NruI で切断して 8 kb の DNA 断片を精製、回収した。またプラスミド pmsmhcN08 も同様に NsiI と NruI で切断し、1.5 kb の DNA 断片を精製、回収し、先の 8 kb の DNA 断片と結合させて、マウス平滑筋型ミオシン重鎖 SM1 アイソフォームの全翻訳領域を含むプラスミド pmSM1 を構築した。プラスミドの構造は NsiI 及び NruI で切断して確認した。

得られた pmSM1 を制限酵素 XbaI と KpnI で切断して 6 kb の DNA 断片を精製、回収した。また発現ベクター PAGE 207 (特開平 6-46841 号公報) のハイグロマイシン B 耐性遺伝子のプロモーター部にある SmaI 部位を欠失させた PAGE 208 を用い、これを XbaI と KpnI で切断して 6 kb の DNA 断片を精製、回収し、先に得られた pmSM1 由来の 6 kb の DNA 断片と結合させて、発現プラスミド pSE-SM1-Hyg を構築した。このプラスミドの構造は XbaI 及び KpnI で切断して確認した。

pmSM1 を XbaI と KpnI で切断した DNA 断片を DNA ブランディングキット (宝酒造社) を用いて平滑化した。更に、発現ベクター pCXN2 を XhoI で切断して DNA ブランディングキット (宝酒造社) を用いて平滑化した。この 2 つの DNA を結合させて、発現プラスミド pCAG-SM1 を構築した。このプラスミドの構造は BglIII で切断して確認した。

前記プラスミド pSE-SM1-Hyg を *Escherichia coli* に組み込んで形質転換体を得た。

なお、本形質転換体は、*Escherichia coli* pSE-SM1-Hyg (FERM BP-4974) として工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に平成 7 年 1 月 24 日付けにて寄託されている。

(実施例 2) CHO 細胞及び HeLa 細胞で SM1 アイソフォームを発現させた際の細胞増殖に与える効果

発現プラスミド pSE-SM1-Hyg 2 μ g とリボフェクトアミン (商品名: ギブコ社製) 4 μ l を混合して 15 分間インキュベートして複合体を作った。これを CHO 細胞あるいは HeLa 細胞に添加して、37℃ で 5 時間インキュベートして遺伝子を導入した。遺伝子導入細胞を希釈してシャーレにまき、ハイグロマイシン (商品名: シグマ社製) で遺伝子導入細胞を選択した。約 10 日後、薬剤耐

性細胞のコロニーをクマシーブルー（商品名：バイオラッド社製）で染色して、面積を画像解析装置で測定した。その結果、対照のベクターPAGE208を導入した場合に比べて面積の小さなコロニーが多く、SM1アイソフォームの発現により増殖が抑制されることが示された（図2、図3）。また、このハイグロマイシン耐性CHO細胞のクローニングを行い、得られたクローンSM1-5-2-1及びSM1-5-3-3の増殖速度を調べたところ、野生型あるいはPAGE208導入細胞と比べ低下していた（図4）。

（実施例3） バルーン傷害ウサギモデルの血管壁にSM1遺伝子を強制導入した時の内膜肥厚抑制効果

体重 2.4～3.2kg の日本白色家兎の大腿動脈からX線透視下、3フレンチ（Fr）のPTCAカテーテルを挿入し右総頸動脈まで誘導した。10気圧で拡張させたバルーンにより右総頸動脈を3回擦過し、血管壁を傷害した。擦過3日後の血管傷害部に対して、pCAG-SM1 300mgとリポフェクチン（GIBCO BRL 社）の混合液をバード社製ヴォリンスキー型インフュージョンカテーテルを用いて、6気圧でインフュージョンした。別の家兎を用い、同様の方法で傷害血管を作製し、pCAG-SM1の代わりに β -ガラクトシダーゼの発現プラスミドを導入して比較例とした。

インフュージョン後3日目にヘパリン生理食塩水により灌流して犠牲せしめた後、右総頸動脈を摘出し、細切後ISOGEN（和光純薬）1mlを加え、ポリトロンホモジナイザーによりホモジナイズした。AGPC法〔ビー・コムジンスキー（P. Chomczynski）とエヌ・サッチ（N. Sacchi）：Anal. Biochem., 162, 156-159（1987）〕により総RNAを抽出した後、RT-PCR法によりSM1のmRNAを増幅した。実施例（SM1遺伝子導入）および比較例（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子導入）につき、増幅させたDNA、及びそれを制限酵素NheIで切断したものをアガロースゲル電気泳動にかけた。実施例には強く、比較例ではわずかにSM1のバンドが検出されたが、実施例のバンドのみがNheIにより切断された。同酵素の切断部位は、家兎のSM1ではなく、マウスSM1のみにあることから、実施例においてマウス由来のSM1遺伝子が発現していることが裏付けられた。

導入2週後に2%パラホルムアルデヒドを含むPBSにより灌流し屠殺、固定

を行い、右総頸動脈を摘出した。インフュージョンカテーテルにより導入された部分を切り出し、パラフィン包埋し、血管の輪切り切片を作製した。1本の血管を4等分し、それぞれの組織から1枚ずつ切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色により染色した。血管の内弾性板を境に内膜を中膜にわけ、それぞれの面積を測定した。得られた各切片につき、内膜面積と中膜面積の比をとり、その平均を取って内膜肥厚度を求めた。実施例3頭、比較例3頭につき内膜肥厚度を求めた結果、SM1遺伝子の強制導入により内膜肥厚が抑制されることが確認された(図5)。

以上の結果から、プラスミドpSE-SM1-Hyg及びpCAG-SM1に細胞増殖低下作用があり、血管細胞の異常増殖により生じる動脈硬化の再狭窄に有効であることが示唆された。

産業上の利用可能性

本発明の平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNAを動物細胞で発現させると、その増殖が抑制されることが明らかとなった。この効果はヒト由来のHeLa細胞においても見られた。したがって、本発明の組換え体DNAはPTCA処置後の再狭窄に対する遺伝子治療剤として有効に用いることができる。

配列表

・ 配列番号 : 1

配列の長さ : 6175

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : マウス

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 105, 6023

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 105, 6020

特徴を決定した方法 : S

配列

```

AGATTGGAC CATCCAGCC TGGGATCAGT GCCAGATCCG AGCTCTCCAT CCGGTGTCCT    60
CCTGCTAATC CACCCCGGA GTAGATCTGG GACCACCAGA CATC ATG GCG CAG AAA    116
                                     Met Ala Gln Lys
                                     1

GGG CAG CTC AGC GAT GAT GAG AAG TTC CTC TTT GTG GAT AAA AAC TTC    164
Gly Gln Leu Ser Asp Asp Glu Lys Phe Leu Phe Val Asp Lys Asn Phe
   5              10              15              20

ATG AAC AGC CCA ATG GCT CAG GCC GAC TGG GTA GCC AAG AAG CTG GTG    212
Met Asn Ser Pro Met Ala Gln Ala Asp Trp Val Ala Lys Lys Leu Val
                25              30              35

TGG GTC CCT TCA GAG AAG CAG GGC TTC GAA GCA GCC AGC ATC AAG GAG    260
Trp Val Pro Ser Glu Lys Gln Gly Phe Glu Ala Ala Ser Ile Lys Glu

```


40	45	50	
GAG AAG GGC GAT GAG GTG GTC GTG GAG TTG GTG GAA AAT GGA AAG AAG			308
Glu Lys Gly Asp Glu Val Val Val Glu Leu Val Glu Asn Gly Lys Lys			
55	60	65	
GTC ACA GTT GGC AAA GAT GAC ATC CAA AAA ATG AAC CCA CCC AAG TTC			356
Val Thr Val Gly Lys Asp Asp Ile Gln Lys Met Asn Pro Pro Lys Phe			
70	75	80	
TCT AAG GTG GAG GAC ATG GCA GAG CTG ACG TGC CTC AAT GAG GCC TCT			404
Ser Lys Val Glu Asp Met Ala Glu Leu Thr Cys Leu Asn Glu Ala Ser			
85	90	95	100
GTG CTG CAC AAC CTG AGG GAG CGA TAC TTC TCA GGC CTC ATC TAT ACC			452
Val Leu His Asn Leu Arg Glu Arg Tyr Phe Ser Gly Leu Ile Tyr Thr			
105	110	115	
TAC TCT GGC CTC TTC TGT GTG GTG GTC AAC CCC TAC AAG TAC CTA CCC			500
Tyr Ser Gly Leu Phe Cys Val Val Val Asn Pro Tyr Lys Tyr Leu Pro			
120	125	130	
ATC TAC TCA GAA AAG ATC GTG GAT ATG TAC AAG GGC AAG AAG AGG CAT			548
Ile Tyr Ser Glu Lys Ile Val Asp Met Tyr Lys Gly Lys Lys Arg His			
135	140	145	
GAG ATG CCG CCT CAC ATC TAT GCC ATT GCC GAC ACA GCC TAC AGA AGC			596
Glu Met Pro Pro His Ile Tyr Ala Ile Ala Asp Thr Ala Tyr Arg Ser			
150	155	160	
ATG CTA CAA GAT CGT GAA GAC CAG TCC ATT CTG TGC ACA GGT GAG TCT			644
Met Leu Gln Asp Arg Glu Asp Gln Ser Ile Leu Cys Thr Gly Glu Ser			
165	170	175	180
GGA GCC GGA AAG ACA GAG AAC ACA CAG AAA GTC ATA CAG TAC TTG GCT			692
Gly Ala Gly Lys Thr Glu Asn Thr Gln Lys Val Ile Gln Tyr Leu Ala			
185	190	195	
GTG GTG GCG TCC TCC CAC AAG GGC AAG AAA GAC AGC AGC ATC ACG GGG			740

Val Val Ala Ser Ser His Lys Gly Lys Lys Asp Ser Ser Ile Thr Gly	
200 205 210	
GAG CTG GAA AAG CAG CTT CTA CAG GCA AAC CCA ATC CTG GAG GCT TTC	788
Glu Leu Glu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Asn Pro Ile Leu Glu Ala Phe	
215 220 225	
GGC AAT GCG AAA ACC GTC AAG AAC GAC AAC TCC TCT CGC TTT GGC AAG	836
Gly Asn Ala Lys Thr Val Lys Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys	
230 235 240	
TTC ATT CGC ATC AAC TTC GAT GTC ACT GGT TAC ATT GTA GGT GCC AAT	884
Phe Ile Arg Ile Asn Phe Asp Val Thr Gly Tyr Ile Val Gly Ala Asn	
245 250 255 260	
ATT GAA ACA TAT CTT CTG GAA AAG TCT AGG GCT ATT CGA CAG GCT AGG	932
Ile Glu Thr Tyr Leu Leu Glu Lys Ser Arg Ala Ile Arg Gln Ala Arg	
265 270 275	
GAT GAG AGA ACA TTT CAC ATC TTC TAC TAC CTG CTC GCC GGA GCC AAG	980
Asp Glu Arg Thr Phe His Ile Phe Tyr Tyr Leu Leu Ala Gly Ala Lys	
280 285 290	
GAA AAG ATG AAA AGT GAC CTG CTT TTG GAG AGC TTC AAC AGC TAC ACA	1028
Glu Lys Met Lys Ser Asp Leu Leu Leu Glu Ser Phe Asn Ser Tyr Thr	
295 300 305	
TTT TTA TCC AAT GGC TTT GTG CCC ATC CCA GCT GCA CAA GAT GAT GAG	1076
Phe Leu Ser Asn Gly Phe Val Pro Ile Pro Ala Ala Gln Asp Asp Glu	
310 315 320	
ATG TTC CAG GAG ACA CTG GAA GCC ATG TCT ATC ATG GGC TTC AAT GAA	1124
Met Phe Gln Glu Thr Leu Glu Ala Met Ser Ile Met Gly Phe Asn Glu	
325 330 335 340	
GAG GAA CAG CTA GCC ATC TTG AAG GTA GTA TCA TCT GTC CTT CAG CTT	1172
Glu Glu Gln Leu Ala Ile Leu Lys Val Val Ser Ser Val Leu Gln Leu	
345 350 355	

GGA AAC ATT GTC TTC AAG AAG GAG CGA AAC ACA GAC CAG GCA TCC ATG	1220
Gly Asn Ile Val Phe Lys Lys Glu Arg Asn Thr Asp Gln Ala Ser Met	
360 365 370	
CCT GAT AAC ACA GCG GCT CAG AAA GTT TGC CAC CTC GTG GGG ATT AAT	1268
Pro Asp Asn Thr Ala Ala Gln Lys Val Cys His Leu Val Gly Ile Asn	
375 380 385	
GTG ACA GAT TTC ACT AGA GCC ATC CTG ACC CCA CGT ATC AAA GTT GGA	1316
Val Thr Asp Phe Thr Arg Ala Ile Leu Thr Pro Arg Ile Lys Val Gly	
390 395 400	
CGG GAT GTG GTG CAG AAG GCT CAG ACC AAA GAA CAG GCT GAC TTC GCC	1364
Arg Asp Val Val Gln Lys Ala Gln Thr Lys Glu Gln Ala Asp Phe Ala	
405 410 415 420	
ATC GAG GCC TTA GCC AAG GCC ACC TAT GAG CGC CTT TTC CGA TGG ATT	1412
Ile Glu Ala Leu Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Arg Leu Phe Arg Trp Ile	
425 430 435	
CTC AGC CGT GTA AAC AAG GCC TTG GAC AAG ACC CAT CGG CAG GGG GCC	1460
Leu Ser Arg Val Asn Lys Ala Leu Asp Lys Thr His Arg Gln Gly Ala	
440 445 450	
TCC TTC CTG GGC ATT CTG GAT ATT GCT GGG TTT GAA ATC TTT GAG GTA	1508
Ser Phe Leu Gly Ile Leu Asp Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Glu Val	
455 460 465	
AAC TCC TTC GAG CAG CTG TGC ATC AAC TAC ACC AAC GAG AAG CTG CAG	1556
Asn Ser Phe Glu Gln Leu Cys Ile Asn Tyr Thr Asn Glu Lys Leu Gln	
470 475 480	
CAG CTG TTC AAC CAC ACG ATG TTC ATC CTG GAG CAG GAA GAG TAC CAG	1604
Gln Leu Phe Asn His Thr Met Phe Ile Leu Glu Gln Glu Glu Tyr Gln	
485 490 495 500	
CGA GAG GGC ATC GAG TGG AAC TTC ATC GAC TTC GGC CTG GAC CTG CAG	1652
Arg Glu Gly Ile Glu Trp Asn Phe Ile Asp Phe Gly Leu Asp Leu Gln	

505	510	515	
CCT AGT ATT GAG CTG ATT GAG CGG CCG AAC AAC CCT CCC GGT GTG CTG			1700
Pro Ser Ile Glu Leu Ile Glu Arg Pro Asn Asn Pro Pro Gly Val Leu			
520	525	530	
GCC CTG CTG GAT GAA GAA TGC TGG TTC CCC AAA GCT ACA GAC AAG TCT			1748
Ala Leu Leu Asp Glu Glu Cys Trp Phe Pro Lys Ala Thr Asp Lys Ser			
535	540	545	
TTT GTG GAG AAG CTA TGC TCA GAG CAG GGA AAT CAC CCC AAA TTT CAG			1796
Phe Val Glu Lys Leu Cys Ser Glu Gln Gly Asn His Pro Lys Phe Gln			
550	555	560	
AAG CCC AAG CAG CTA AAG GAC AAA ACA GAG TTC TCC ATC ATC CAC TAT			1844
Lys Pro Lys Gln Leu Lys Asp Lys Thr Glu Phe Ser Ile Ile His Tyr			
565	570	575	580
GCT GGG AAG GTG GAC TAC AAT GCA AGT GCC TGG CTG ACC AAG AAC ATG			1892
Ala Gly Lys Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ala Trp Leu Thr Lys Asn Met			
585	590	595	
GAC CCG CTA AAT GAC AAT GTG ACA TCA CTC CTC AAT GCC TCC TCT GAC			1940
Asp Pro Leu Asn Asp Asn Val Thr Ser Leu Leu Asn Ala Ser Ser Asp			
600	605	610	
AAG TTT GTG GCT GAC CTG TGG AAG GAT GTG GAC CGC ATT GTG GGG CTG			1988
Lys Phe Val Ala Asp Leu Trp Lys Asp Val Asp Arg Ile Val Gly Leu			
615	620	625	
GAC CAG ATG GCC AAG ATG ACT GAG AGC TCA CTG CCC AGT GCC TCA AAG			2036
Asp Gln Met Ala Lys Met Thr Glu Ser Ser Leu Pro Ser Ala Ser Lys			
630	635	640	
ACC AAA AAG GGC ATG TTC CGC ACC GTG GGA CAG CTC TAC AAA GAG CAG			2084
Thr Lys Lys Gly Met Phe Arg Thr Val Gly Gln Leu Tyr Lys Glu Gln			
645	650	655	660
TTG GGG AAA CTG ATG GCT ACA CTG CGC AAT ACC ACG GCT AAC TTT GTG			2132

Leu Gly Lys Leu Met Ala Thr Leu Arg Asn Thr Thr Ala Asn Phe Val	
665 670 675	
CGC TGC ATC ATC CCC AAC CAT GAG AAG AGG TCT GGC AAG CTG GAT GCA	2180
Arg Cys Ile Ile Pro Asn His Glu Lys Arg Ser Gly Lys Leu Asp Ala	
680 685 690	
TTT CTA GTG CTG GAA CAG CTG CGC TGC AAC GGT GTG TTG GAA GGC ATC	2228
Phe Leu Val Leu Glu Gln Leu Arg Cys Asn Gly Val Leu Glu Gly Ile	
695 700 705	
CGC ATC TGC CGT CAG GGC TTC CCC AAC AGG ATT GTC TTC CAA GAG TTC	2276
Arg Ile Cys Arg Gln Gly Phe Pro Asn Arg Ile Val Phe Gln Glu Phe	
710 715 720	
CGG CAA CGC TAT GAG ATC CTG GCA GCG AAC GCC ATC CCC AAA GGC TTC	2324
Arg Gln Arg Tyr Glu Ile Leu Ala Ala Asn Ala Ile Pro Lys Gly Phe	
725 730 735 740	
ATG GAT GGA AAG CAA GCC TGC ATT CTC ATG ATC AAA GCC CTC GAA CTT	2372
Met Asp Gly Lys Gln Ala Cys Ile Leu Met Ile Lys Ala Leu Glu Leu	
745 750 755	
GAC CCT AAC CTG TAC AGG ATT GGG CAG AGC AAA ATC TTC TTC CGA ACG	2420
Asp Pro Asn Leu Tyr Arg Ile Gly Gln Ser Lys Ile Phe Phe Arg Thr	
760 765 770	
GGG GTC CTG GCC CAC CTA GAG GAG GAA CGA GAC CTG AAA ATT ACT GAT	2468
Gly Val Leu Ala His Leu Glu Glu Glu Arg Asp Leu Lys Ile Thr Asp	
775 780 785	
GTC ATC ATG GCC TTC CAG GCA ATG TGT CGT GGC TAC CTT GCC AGA AAG	2516
Val Ile Met Ala Phe Gln Ala Met Cys Arg Gly Tyr Leu Ala Arg Lys	
790 795 800	
GCC TTC ACC AAG AGG CAG CAA CAG CTG ACA GCC ATG AAG GTG ATC CAG	2564
Ala Phe Thr Lys Arg Gln Gln Gln Leu Thr Ala Met Lys Val Ile Gln	
805 810 815 820	

AGG AAC TGC GCT GCC TAC CTT AAG CTC CGC AAC TGG CAA TGG TGG CGG	2612
Arg Asn Cys Ala Ala Tyr Leu Lys Leu Arg Asn Trp Gln Trp Trp Arg	
825 830 835	
CTC TTC ACC AAA GTA AAG CCA TTG CTC CAG GTG ACA CGG CAG GAG GAG	2660
Leu Phe Thr Lys Val Lys Pro Leu Leu Gln Val Thr Arg Gln Glu Glu	
840 845 850	
GAG ATG CAG GCC AAG GAG GAG GAG ATG CAA AAG ATC ACG GAG CGG CAG	2708
Glu Met Gln Ala Lys Glu Glu Glu Met Gln Lys Ile Thr Glu Arg Gln	
855 860 865	
CAG AAG GCA GAG ACT GAG TTG AAG GAG CTG GAG CAG AAG CAC ACT CAG	2756
Gln Lys Ala Glu Thr Glu Leu Lys Glu Leu Glu Gln Lys His Thr Gln	
870 875 880	
CTG GCT GAG GAG AAG ACT CTG CTG CAG GAG CAG TTG CAG GCA GAG ACA	2804
Leu Ala Glu Glu Lys Thr Leu Leu Gln Glu Gln Leu Gln Ala Glu Thr	
885 890 895 900	
GAG CTG TAT GCT GAG TCT GAG GAG ATG CGG GTC CGG TTG GCA GCC AAG	2852
Glu Leu Tyr Ala Glu Ser Glu Glu Met Arg Val Arg Leu Ala Ala Lys	
905 910 915	
AAG CAG GAA CTG GAG GAG ATC CTA CAT GAG ATG GAG GCC CGC CTG GAG	2900
Lys Gln Glu Leu Glu Glu Ile Leu His Glu Met Glu Ala Arg Leu Glu	
920 925 930	
GAA GAG GAA GAC CGG CGC CAG CAA CTA CAG GCT GAG AGG AAG AAG ATG	2948
Glu Glu Glu Asp Arg Arg Gln Gln Leu Gln Ala Glu Arg Lys Lys Met	
935 940 945	
GCT CAG CAG ATG CTA GAC CTG GAG GAG CAA CTG GAG GAG GAA GAG GCC	2996
Ala Gln Gln Met Leu Asp Leu Glu Glu Gln Leu Glu Glu Glu Glu Ala	
950 955 960	
GCC AGA CAG AAA CTA CAG CTA GAG AAG GTC ACG GCT GAG GCC AAG ATC	3044
Ala Arg Gln Lys Leu Gln Leu Glu Lys Val Thr Ala Glu Ala Lys Ile	

965	970	975	980	
AAG AAA CTG GAG GAT GAC ATC TTG GTT ATG GAT GAT CAG AAC AGT AAA				3092
Lys Lys Leu Glu Asp Asp Ile Leu Val Met Asp Asp Gln Asn Ser Lys				
	985	990	995	
CTT TCA AAA GAA CGA AAA CTC CTT GAA GAG AGG GTC AGC GAC TTG ACA				3140
Leu Ser Lys Glu Arg Lys Leu Leu Glu Glu Arg Val Ser Asp Leu Thr				
	1000	1005	1010	
ACC AAC CTA GCA GAA GAG GAA GAA AAG GCT AAA AAC CTC ACA AAG CTG				3188
Thr Asn Leu Ala Glu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Asn Leu Thr Lys Leu				
	1015	1020	1025	
AAG AGC AAG CAT GAG TCT ATG ATC TCA GAG CTG GAG GTG AGG CTG AAG				3236
Lys Ser Lys His Glu Ser Met Ile Ser Glu Leu Glu Val Arg Leu Lys				
	1030	1035	1040	
AAA GAG GAG AAG AGC CGG CAG GAG CTG GAG AAA CTC AAG AGG AAA CTG				3284
Lys Glu Glu Lys Ser Arg Gln Glu Leu Glu Lys Leu Lys Arg Lys Leu				
1045	1050	1055	1060	
GAG GGT GAT GCC AGT GAC TTC CAT GAG CAG ATC GCT GAC TTG CAG GCC				3332
Glu Gly Asp Ala Ser Asp Phe His Glu Gln Ile Ala Asp Leu Gln Ala				
	1065	1070	1075	
CAG ATT GCA GAG CTC AAG ATG CAG CTG GCA AAG AAA GAG GAA GAG CTA				3380
Gln Ile Ala Glu Leu Lys Met Gln Leu Ala Lys Lys Glu Glu Glu Leu				
	1080	1085	1090	
CAG GCA GCT CTA GCC AGG CTT GAT GAA GAG ATC GCC CAG AAA AAC AAT				3428
Gln Ala Ala Leu Ala Arg Leu Asp Glu Glu Ile Ala Gln Lys Asn Asn				
	1095	1100	1105	
GCC CTA AAG AAG ATT CGC GAG CTA GAG GGC CAT ATC TCA GAC CTA CAA				3476
Ala Leu Lys Lys Ile Arg Glu Leu Glu Gly His Ile Ser Asp Leu Gln				
	1110	1115	1120	
GAG GAC CTA GAC TCA GAG CGG GCT GCC AGG AAC AAG GCC GAG AAG CAG				3524

Glu Asp Leu Asp Ser Glu Arg Ala Ala Arg Asn Lys Ala Glu Lys Gln
 1125 1130 1135 1140
 AAG CGA GAC CTG GGG GAG GAG CTG GAG GCA CTC AAG ACG GAG CTG GAG 3572
 Lys Arg Asp Leu Gly Glu Glu Leu Glu Ala Leu Lys Thr Glu Leu Glu
 1145 1150 1155
 GAT ACG CTG GAC AGC ACA GCT ACC CAG CAG GAG CTC AGA GCC AAG AGG 3620
 Asp Thr Leu Asp Ser Thr Ala Thr Gln Gln Glu Leu Arg Ala Lys Arg
 1160 1165 1170
 GAA CAG GAG GTG ACA GTG CTG AAG AAG GCC CTG GAT GAG GAG ACG CGG 3668
 Glu Gln Glu Val Thr Val Leu Lys Lys Ala Leu Asp Glu Glu Thr Arg
 1175 1180 1185
 TCC CAT GAG GCC CAG GTC CAG GAG ATG AGG CAG AAG CAC ACA CAG GCA 3716
 Ser His Glu Ala Gln Val Gln Glu Met Arg Gln Lys His Thr Gln Ala
 1190 1195 1200
 GTG GAG GAA CTC ACA GAG CAG CTG GAG CAG TTC AAA AGG GCC AAG GCA 3764
 Val Glu Glu Leu Thr Glu Gln Leu Glu Gln Phe Lys Arg Ala Lys Ala
 1205 1210 1215 1220
 AAC CTG GAC AAA AGC AAG CAG ACA CTG GAG AAG GAG AAC GCG GAC CTG 3812
 Asn Leu Asp Lys Ser Lys Gln Thr Leu Glu Lys Glu Asn Ala Asp Leu
 1225 1230 1235
 GCT GGG GAG CTG CGT GTC CTG GGC CAG GCG AAG CAG GAG GTG GAA CAC 3860
 Ala Gly Glu Leu Arg Val Leu Gly Gln Ala Lys Gln Glu Val Glu His
 1240 1245 1250
 AAG AAG AAG AAG CTG GAG GTG CAG CTG CAG GAT CTG CAG TCC AAG TGC 3908
 Lys Lys Lys Lys Leu Glu Val Gln Leu Gln Asp Leu Gln Ser Lys Cys
 1255 1260 1265
 AGT GAT GGG GAG CGT GCC CGG GCT GAG CTC AGT GAC AAG GTC CAC AAG 3956
 Ser Asp Gly Glu Arg Ala Arg Ala Glu Leu Ser Asp Lys Val His Lys
 1270 1275 1280

CTA CAG AAT GAA GTG GAG AGT GTC ACT GGC ATG CTC AAT GAG GCA GAG	4004
Leu Gln Asn Glu Val Glu Ser Val Thr Gly Met Leu Asn Glu Ala Glu	
1285 1290 1295 1300	
GGC AAA GCC ATC AAA CTG GCC AAA GAT GTG GCT TCC CTT GGA TCC CAG	4052
Gly Lys Ala Ile Lys Leu Ala Lys Asp Val Ala Ser Leu Gly Ser Gln	
1305 1310 1315	
CTT CAG GAC ACC CAA GAG CTG CTC CAA GAA GAA ACC CGG CAG AAG CTC	4100
Leu Gln Asp Thr Gln Glu Leu Leu Gln Glu Glu Thr Arg Gln Lys Leu	
1320 1325 1330	
AAT GTG TCT ACC AAG CTG CGT CAG TTG GAA GAT GAA AGG AAC AGC CTG	4148
Asn Val Ser Thr Lys Leu Arg Gln Leu Glu Asp Glu Arg Asn Ser Leu	
1335 1340 1345	
CAG GAC CAG CTG GAT GAG GAG ATG GAG GCT AAG CAA AAC CTG GAG CGC	4196
Gln Asp Gln Leu Asp Glu Glu Met Glu Ala Lys Gln Asn Leu Glu Arg	
1350 1355 1360	
CAT GTC TCA ACA CTG AAC ATT CAG CTC TCA GAC TCT AAG AAG AAG CTG	4244
His Val Ser Thr Leu Asn Ile Gln Leu Ser Asp Ser Lys Lys Lys Leu	
1365 1370 1375 1380	
CAG GAC TTT GCA AGT ACC ATC GAG GTC ATG GAG GAG GGG AAG AAG AGG	4292
Gln Asp Phe Ala Ser Thr Ile Glu Val Met Glu Glu Gly Lys Lys Arg	
1385 1390 1395	
TTA CAG AAA GAG ATG GAG GGC CTC AGC CAG CAG TAT GAG GAG AAG GCG	4340
Leu Gln Lys Glu Met Glu Gly Leu Ser Gln Gln Tyr Glu Glu Lys Ala	
1400 1405 1410	
GCT GCC TAT GAC AAA CTG GAG AAA ACC AAG AAC AGG CTC CAG CAG GAG	4388
Ala Ala Tyr Asp Lys Leu Glu Lys Thr Lys Asn Arg Leu Gln Gln Glu	
1415 1420 1425	
CTG GAT GAC CTG GTC GTG GAC TTG GAC AAC CAG CGG CAA CTG GTA TCC	4436
Leu Asp Asp Leu Val Val Asp Leu Asp Asn Gln Arg Gln Leu Val Ser	

1430	1435	1440	
AAT CTG GAA AAG AAG CAG AAG AAA TTT GAC CAG TTG TTA GCT GAG GAG			4484
Asn Leu Glu Lys Lys Gln Lys Lys Phe Asp Gln Leu Leu Ala Glu Glu			
1445	1450	1455	1460
AAG AAC ATC TCC TCC AAG TAT GCG GAT GAG AGA GAC CGA GCT GAA GCA			4532
Lys Asn Ile Ser Ser Lys Tyr Ala Asp Glu Arg Asp Arg Ala Glu Ala			
1465	1470	1475	
GAG GCC AGG GAA AAG GAG ACA AAG GCT TTG TCT CTA GCC CGG GCC CTG			4580
Glu Ala Arg Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ser Leu Ala Arg Ala Leu			
1480	1485	1490	
GAG GAA GCC CTG GAA GCC AAA GAA GAG CTG GAG AGG ACC AAC AAG ATG			4628
Glu Glu Ala Leu Glu Ala Lys Glu Glu Leu Glu Arg Thr Asn Lys Met			
1495	1500	1505	
CTC AAA GCT GAG ATG GAA GAC CTG GTC AGC TCC AAG GAT GAT GTA GGC			4676
Leu Lys Ala Glu Met Glu Asp Leu Val Ser Ser Lys Asp Asp Val Gly			
1510	1515	1520	
AAG AAC GTG CAT GAA CTG GAG AAG TCC AAG CGT GCC TTG GAG ACC CAG			4724
Lys Asn Val His Glu Leu Glu Lys Ser Lys Arg Ala Leu Glu Thr Gln			
1525	1530	1535	1540
ATG GAA GAG ATG AAA ACC CAG CTG GAG GAG TCG GAG GAT GAC GTG CAG			4772
Met Glu Glu Met Lys Thr Gln Leu Glu Glu Ser Glu Asp Asp Val Gln			
1545	1550	1555	
GCC ACT GAG GAT GCC AAG CTG CGG CTA GAG GTC AAC ATG CAG GCC CTC			4820
Ala Thr Glu Asp Ala Lys Leu Arg Leu Glu Val Asn Met Gln Ala Leu			
1560	1565	1570	
AAG GGC CAG TTT GAA CGC GAT CTC CAG GCT CGG GAT GAA CAG AAT GAG			4868
Lys Gly Gln Phe Glu Arg Asp Leu Gln Ala Arg Asp Glu Gln Asn Glu			
1575	1580	1585	
GAG AAG AGG AGG CAG CTA CAG CGG CAG CTG CAC GAG TAT GAG ACA GAA			4916

Glu Lys Arg Arg Gln Leu Gln Arg Gln Leu His Glu Tyr Glu Thr Glu
 1590 1595 1600
 CTG GAA GAT GAA CGG AAG CAG AGA GCT CTG GCG GCG GCA GCT AAG AAG 4964
 Leu Glu Asp Glu Arg Lys Gln Arg Ala Leu Ala Ala Ala Lys Lys
 1605 1610 1615 1620
 AAG CTG GAA GGG GAC CTA AAA GAC CTA GAG CTC CAG GCT GAC TCA GCC 5012
 Lys Leu Glu Gly Asp Leu Lys Asp Leu Glu Leu Gln Ala Asp Ser Ala
 1625 1630 1635
 ATC AAA GGG AGG GAG GAA GCC ATC AAG CAG CTT CGA AAA CTG CAG GCT 5060
 Ile Lys Gly Arg Glu Glu Ala Ile Lys Gln Leu Arg Lys Leu Gln Ala
 1640 1645 1650
 CAG ATG AAG GAC TTC CAA AGA GAG CTG GAT GAT GCC CGT GCC TCC AGG 5108
 Gln Met Lys Asp Phe Gln Arg Glu Leu Asp Asp Ala Arg Ala Ser Arg
 1655 1660 1665
 GAT GAG ATC TTT GCC ACC TCA AAA GAG AAT GAG AAG AAA GCC AAG AGT 5156
 Asp Glu Ile Phe Ala Thr Ser Lys Glu Asn Glu Lys Lys Ala Lys Ser
 1670 1675 1680
 CTG GAG GCA GAC CTC ATG CAG CTC CAA GAG GAC CTG GCA GCA GCT GAG 5204
 Leu Glu Ala Asp Leu Met Gln Leu Gln Glu Asp Leu Ala Ala Ala Glu
 1685 1690 1695 1700
 AGA GCT CGC AAG CAA GCT GAC CTG GAG AAG GAG GAG CTG GCC GAG GAG 5252
 Arg Ala Arg Lys Gln Ala Asp Leu Glu Lys Glu Glu Leu Ala Glu Glu
 1705 1710 1715
 CTG GCT AGC AGC TTG TCA GGA AGG AAT ACA CTG CAG GAT GAG AAG CGC 5300
 Leu Ala Ser Ser Leu Ser Gly Arg Asn Thr Leu Gln Asp Glu Lys Arg
 1720 1725 1730
 CGC CTG GAG GCA AGG ATC GCC CAA CTA GAG GAG GAG CTG GAG GAA GAG 5348
 Arg Leu Glu Ala Arg Ile Ala Gln Leu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Glu
 1735 1740 1745

CAG GGC AAC ATG GAG GCC ATG AGT GAT AGA GTA CGC AAG GCC ACA CTG	5396
Gln Gly Asn Met Glu Ala Met Ser Asp Arg Val Arg Lys Ala Thr Leu	
1750 1755 1760	
CAG GCT GAG CAA CTG AGC AAT GAG CTG GCC ACA GAA CGC AGC ACG GCT	5444
Gln Ala Glu Gln Leu Ser Asn Glu Leu Ala Thr Glu Arg Ser Thr Ala	
1765 1770 1775 1780	
CAG AAG AAT GAG AGC GCA CGG CAA CAG CTG GAG CGC CAG AAC AAG GAA	5492
Gln Lys Asn Glu Ser Ala Arg Gln Gln Leu Glu Arg Gln Asn Lys Glu	
1785 1790 1795	
CTG CGA AGC AAG TTG CAG GAG GTA GAA GGT GCT GTC AAA GCC AAG CTC	5540
Leu Arg Ser Lys Leu Gln Glu Val Glu Gly Ala Val Lys Ala Lys Leu	
1800 1805 1810	
AAG TCC ACT GTT GCG GCG CTG GAG GCC AAG ATT GCA CAG CTG GAG GAG	5588
Lys Ser Thr Val Ala Ala Leu Glu Ala Lys Ile Ala Gln Leu Glu Glu	
1815 1820 1825	
CAG GTT GAA CAG GAG GCC AGA GAG AAA CAG GCG GCC ACC AAG TCG CTG	5636
Gln Val Glu Gln Glu Ala Arg Glu Lys Gln Ala Ala Thr Lys Ser Leu	
1830 1835 1840	
AAG CAA AAG GAC AAG AAG CTA AAG GAG GTC CTG CTG CAG GTG GAG GAT	5684
Lys Gln Lys Asp Lys Lys Leu Lys Glu Val Leu Leu Gln Val Glu Asp	
1845 1850 1855 1860	
GAG CGC AAG ATG GCA GAG CAG TAC AAG GAG CAG GCA GAG AAA GGA AAC	5732
Glu Arg Lys Met Ala Glu Gln Tyr Lys Glu Gln Ala Glu Lys Gly Asn	
1865 1870 1875	
ACC AAG GTC AAG CAG CTG AAG AGG CAG CTG GAA GAG GCA GAG GAG GAG	5780
Thr Lys Val Lys Gln Leu Lys Arg Gln Leu Glu Glu Ala Glu Glu Glu	
1880 1885 1890	
TCC CAG TGC ATC AAC GCC AAC CGC AGG AAG CTG CAG CGG GAG CTA GAT	5828
Ser Gln Cys Ile Asn Ala Asn Arg Arg Lys Leu Gln Arg Glu Leu Asp	

1895	1900	1905	
GAG GCC ACA GAG AGC AAT GAG GCC ATG GGC CGT GAG GTG AAC GCC CTC			5876
Glu Ala Thr Glu Ser Asn Glu Ala Met Gly Arg Glu Val Asn Ala Leu			
1910	1915	1920	
AAG AGC AAA CTC AGG AGA GGA AAC GAG GCT TCA TTT GTT CCT TCC AGA			5924
Lys Ser Lys Leu Arg Arg Gly Asn Glu Ala Ser Phe Val Pro Ser Arg			
1925	1930	1935	1940
AGG GCT GGG GGC CGT AGA GTT ATT GAA AAC ACA GAT GGT TCT GAA GAA			5972
Arg Ala Gly Gly Arg Arg Val Ile Glu Asn Thr Asp Gly Ser Glu Glu			
1945	1950	1955	
GAA ATG GAC GCT CGG GAC TCA GAC TTC AAT GGA ACC AAA GCC AGT GAA			6020
Glu Met Asp Ala Arg Asp Ser Asp Phe Asn Gly Thr Lys Ala Ser Glu			
1960	1965	1970	
TAAATTCAGG ATTGGACACC ATGTCAGGGA AAACAGAACA CTAAACGACA GCAGAGCCCA			6080
GCAGACTGCT TAGCACTTGT GTCCATTCTG TCTCAAGTCA CAGAAATCAC TCCACCCCTC			6140
ACCAGGAGTC AACCACAGCC CTGCACAAAG GGTGT			6175

配列番号 : 2

配列の長さ : 5919

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を決定した方法 : S

配列

ATG GCG CAG AAN GGN CAN CTC AGC GAN GAT GAG AAG TTC CTC TTT GTG	48
GAN AAN AAC TTC ATN AAC AGC CCN NTG GCN CAG GCC GAC TGG GTN GCC	96
AAG ANG CTG GTG TGG GTC CCT TCN GAG AAG CAG GGC TTC GAN GCN GCC	144
AGC ATC AAG GAG GAG AAG GGN GAT GAG GTG GTC GTG GAG NTG GTG GAN	192

AAT GGN AAG AAG GTC ACN GTN GGC AAN GAT GAC ATC CAN AAN ATG AAC	240
CCN CCC AAG TTC TCN AAG GTG GAN GAC ATG GCN GAG CTG ACG TGB CTC	288
AAN GAN GCN TCN GTG CTG CAC AAC CTG AGG GAG VGN TAC TTC TCN GGN	336
CTC ATC TAN ACN TAC TCN GGC CTC TTC TGB GTG GTG GTC AAC CCC TAC	384
AAG YAS CTN CCC ATC TAC TCN GAN AAG ATC GTG GAN ATG TAC AAG GGC	432
AAG AAG AGG CAN GAG ATG CCN CCN CAC ATC TAB GCC ATN GCC GAC ACN	480
GCC TAC AGN AGC ATG CTN CAN GAT CGN GAN GAC CAG TCC ATT CTN TGC	528
ACA GGN GAG TCT GGA GCC GGN AAG ACN GAG AAC ACN VAG AAA GTC ATN	576
CAG TAC NTG GCN GTG GTG GCN TCN TCC CAC AAG GGC AAG AAN GAC ANN	624
AGC ATC ACG GGG GAG CTG GAN AAG CAG CTT CTN CAN GCA AAC CCN ATC	672
CTG GAG GCN TTN GGC AAN GCN AAN ACN GTC AAG AAN GAC AAC TCC TCN	720
CGN TTN GGC AAG TTC ATN CGC ATC AAC TTN GAN GTC ACT GGT TAC ATN	768
GTN GGN GCC AAN ATT GAN ACN TAT CTN CTG GAA AAG TCN VGN GCN ATN	816
CGN CAN GCN VGN GAN GAG AGN ACN TTN CAC ATC TTN TAC TAC CTG NTN	864
GCN GGN GCC AAG GAN AAG ATG ANA ANT GAC NTG CTN TTG GAG NGC TTC	912
AAC ANC TAC ACA TTN NTN TCC AAT GGC TTT GTG CCC ATC CCA GCN GCN	960
CAN GAT GAN GAG ATG TTC CAG GAN ACN NTG GAN GCC ATG TCN ATC ATG	1008
GGC TTC ANT GAA GAG GAN CAG CTN NCN NTN TTG AAG GTN GTN TCN TCN	1056
GTC CTN CAG CTT GGA AAC ATN GTC TTC AAG AAG GAN VGA AAC ACA GAC	1104
CAG GCN TCC ATG CCN GAN AAC ACA GCN GCN CAG AAA GTT TGC CAC CTC	1152
NTG GGN ATT AAN GTG ACA GAT TTC ACN AGA NCC ATC CTG ACC CCN CGT	1200
ATC AAA GTT GGA CGG GAN GTN GTG CAG AAN GCT CAG ACN AAA GAA CAG	1248
GCN GAC TTC GCN NTC GAG GCN TTN GCN AAG GCC ACN TAT GAN CGC CTT	1296
TTC CGN TGG ATN CTC AGC CGT GTN AAC AAN GCC NTG GAC AAG ACC CAT	1344
CGG CAG GGG GCN TCC TTC CTG GGN ATN CTG GAN ATN GCT GGN TTT GAN	1392
ATC TTT GAG GTN AAC TCC TTC GAG CAG CTG TGC ATC AAC TAC ACC AAC	1440
GAG AAG CTG CAG CAG CTG TTC AAC CAC ACN ATG TTC ATC CTG GAG CAG	1488
GAN GAG TAC CAG CGN GAG GGC ATC GAG TGG AAC TTC ATC GAC TTC GGN	1536
CTN GAC CTG CAG CCN WGY ATT GAG CTN ATT GAG CGG CCG AAC AAC CCT	1584

CCN GGT GTG CTG GCC CTG CTG GAT GAN GAN TGC TGG TTC CCC AAA GCN	1632
ACA GAN AAG TCT TTT GTG GAG AAG CTN TGC NCA GAG CAN GGN AAN CAC	1680
CCC AAN TTN CAG AAG CCC AAG CAG CTN AAG GAC AAA ACN GAG TTC TCC	1728
ATC ATC CAN TAN GCT GGG AAG GTG GAC TAC AAN GCN AGT GCC TGG CTG	1776
ACC AAG AAC ATG GAC CCN CTN AAT GAC AAN GTG ACN TCN CTC CTC AAN	1824
GCC TCC TCN GAC AAG TTN GTG GCN GAC CTN TGG AAG GAN GTG GAC CGC	1872
ATN GTG GGG CTG GAC CAG ATG GCC AAG ATG ACN GAG AGC TCA CTG CCC	1920
AGN GCC TCN AAG ACC AAN AAG GGC ATG TTC CGC ACN GTG GGN CAG CTN	1968
TAC AAN GAG CAG NTG GGG AAN CTG ATG NCN ACN CTG CGC AAN ACC ACG	2016
NCN AAC TTN GTG CGC TGC ATC ATC CCC AAC CAN GAG AAG NGG TCN GGC	2064
AAG CTG GAN GCN TTN CTN GTG CTG GAN CAG CTG CGN TGC AAC GGN GTG	2112
NTG GAA GGC ATC CGN ATC TGC CGN CAG GGC TTC CCC AAC AGG ATN GTC	2160
TTC CAN GAG TTC CGN CAA CGC TAN GAG ATC CTG GCA GCN AAC GCC ATC	2208
CCC AAN GGC TTC ATG GAT GGN AAG CAA GCC TGC ATT CTC ATG ATC AAA	2256
GCN CTN GAA CTN GAC CCN AAC NTG TAC AGG ATN GGG CAG AGC AAA ATC	2304
TTC TTC CGN ACG GGN GTN CTG GCC CAC CTN GAG GAG GAN CGN GAC NTG	2352
AAN ATN ACN GAN GTC ATC ATG GCC TTC CAG GCN ATG TGT CGT GGC TAC	2400
CTN GCC VGN AAG GCC TTC NCC AAG NGG CAG CAN CAG CTG ACN GCC ATG	2448
AAG GTG ATC CAG AGG AAC TGC GCN GCC TAC CTN AAG CTN CGN AAC TGG	2496
CAN TGG TGG CGN CTC TTC ACC AAN GTN AAG CCN NTG CTN CAG GTG ACA	2544
CGG CAG GAG GAG GAG ATG CAG GCC AAG GAG GAN GAG NTG CAN AAG ATC	2592
ANG GAG CGN CAG CAG AAG GCN GAG ANN GAG NTN VAG GAG CTG VAG CAG	2640
AAG CAC ACN CAG CTG NCN GAG GAG AAG ANN CTG CTG CAG GAG CAG NTG	2688
CAG GCN GAG ACN GAG CTG TAN GCN GAG NCN GAG GAG ATG CGN GTC CGG	2736
NTG GCN GCC AAG AAG CAG GAN CTG GAG GAN ATC CTN CAT GAG ATG GAG	2784
GCC CGC CTG GAG GAN GAG GAA GAC CGG NGC CAG CAN CTN CAG GCN GAG	2832
AGG AAG AAG ATG GCN CAG CAG ATG CTN GAC CTG GAN GAG CAA CTG GAG	2880
GAG GAN GAN GCN GCC AGN CAG AAN CTA CAG CTN GAN AAG GTC ACN GCN	2928
GAG GCC AAG ATC AAG AAN NTG GAG GAN GAC ATC NTG GTN ATG GAN GAT	2976

CAG AAC ANN AAN CTN TCA AAA GAN CGA AAA CTC CTN GAA GAG AGG NTN	3024
AGN GAN TTN ACA ACN AAN CTN GCN GAN GAG GAA GAN AAG GCN AAN AAC	3072
CTN ACN AAG CTG AAG ANC AAG CAT GAN TCN ATG ATC TCA GAN CTG GAN	3120
GTG NGG CTG AAG AAN GAG GAG AAG AGC CGG CAG GAG CTG GAG AAN CTN	3168
AAG NGG AAN NTG GAN GGN GAN GCC AGT GAC NTC CAN GAG CAG ATC GCN	3216
GAC NTN CAG GCN CAG ATN GCA GAG CTC AAG ATG CAG CTG GCN AAG AAN	3264
GAN GAN GAG CTN CAG GCN GCN CTN GCC AGG CTN GAN GAN GAN ANN NCN	3312
CAG AAN AAC AAN GCC CTN AAG AAG ATN CGN GAG CTN GAG GGN CAN ATC	3360
TCN GAC CTN CAN GAG GAC CTN GAC TCA GAG CGG GCN GCC AGG AAC AAG	3408
GCN GAN AAG CAG AAG CGA GAC CTN GGN GAG GAG CTG GAG GCN CTN AAG	3456
ACN GAG CTG GAN GAN ACN CTG GAC ANC ACN GCN ACN CAG CAG GAG CTC	3504
VGN GCC AAG NGG GAN CAG GAG GTG ACN GTG CTG AAG AAG GCC CTG GAN	3552
GAN GAG ACN CGG TCC CAT GAG GCN CAG GTC CAG GAG ATG AGG CAG AAN	3600
CAC NCA CAG GNN GTG GAG GAN CTC ACN GAG CAG CTN GAN CAG TTC AAN	3648
AGG GCC AAG GCN AAC CTN GAC AAN ANC AAG CAG ACN CTG GAG AAN GAG	3696
AAC GCN GAC CTG GCN GGN GAG CTG CGN GTC CTG GGC CAG GCN AAG CAG	3774
GAG GTG GAN CAN AAG AAG AAG AAG CTG GAG GNG CAG NTG CAG GAN CTG	3792
CAG TCC AAG TGC AGN GAT GGG GAG CGN GCC CGG GCN GAG CTC ANN GAC	3840
AAN GTC CAC AAG CTN CAG AAT GAA GTN GAG AGN GTC ACN GGN ATG CTN	3888
ANN GAG GCN GAG GGN AAN GCC ATN AAN CTG GCC AAN GAN GTG GCN TCC	3936
CTN GGN TCC CAG CTN CAG GAN ACC CAN GAG CTG CTN CAA GAA GAA ACC	3984
CGG CAG AAG CTC AAN GTG TCN ACN AAG CTG CGN CAG NTG GAN GAN GAN	4032
NGG AAC AGC CTG CAN GAN CAG CTG GAN GAG GAG ATG GAG GCN AAG CAN	4080
AAC CTG GAG CGC CAN NTC TCN ACN CTN AAC ATN CAG CTC TCN GAC TCN	4128
AAG AAG AAG CTG CAG GAC TTT GCN AGN ACC NTN GAN NNY NTG GAN GAN	4176
GGN AAG AAG AGG TTN CAG AAN GAN ATN GAG NNC CTC ANC CAG CAG TAY	4224
GAN GAG AAN GCN GCN GCN TAN GAN AAA CTG GAN AAN ACC AAG AAC AGG	4272
CTN CAG CAG GAG CTG GAN GAC CTG GTN GTN GAN TTG GAN AAC CAG CGG	4320
CAA CTN GTN TCC AAN CTG GAA AAG AAG CAG ANG AAN TTN GAN CAG TTG	4368

TTA GCN GAG GAN AAN AAC ATC TCN TCC AAN TAN GCG GAT GAN AGN GAC 4416
 VGA GCN GAN GCN GAN GCN AGG GAN AAG GAN ACN AAG GCN NTG TCN CTN 4464
 GCN CGG GCC CTN GAN GAN GCC NTG GAN GCC AAA GAN GAN CTN GAG VGN 4512
 ACC AAC AAN ATG CTC AAN GCN GAN ATG GAA GAC CTN GTC AGC TCC AAG 4560
 GAN GAN GTN GGC AAG AAC GTN CAT GAN CTG GAG AAG TCC AAG CGN GCC 4608
 NTG GAG ACN CAG ATG GAN GAG ATG AAN ACN CAG CTG GAN GAG YYR GAG 4656
 GAN GAN NTG CAN GCC ACN GAG GAN GCC AAN CTG CGG NTN GAN GTC AAC 4704
 ATG CAG GCN CTC AAN GNC CAG TTN GAN VGN GAT CTC CAN GCN CGG GAN 4752
 GAN CAG AAN GAG GAG AAG AGG AGG CAN CTN CAG VGN CAG CTN CAN GAG 4800
 TAN GAG ACN GAA CTG GAA GAN GAN CGN AAG CAN VGN GCN CTG GCN GCN 4848
 GCA GCN AAG AAG AAG CTG GAN GGG GAC CTN AAA GAC CTN GAG CTN CAG 4896
 GCN GAC TCN GCC ATC AAN GGG NGG GAG GAA GCC ATC AAG CAG CTN CNN 4944
 AAA CTG CAG GCT CAG ATG AAG GAC TTN CAN AGA GAN CTG GAN GAT GCC 4992
 CGT GCC TCC AGN GAN GAG ATC TTT GCC ACN NCN AAN GAG AAN GAG AAG 5040
 AAA GCC AAG AGN NTG GAN GCA GAC CTC ATG CAG CTN CAA GAG GAN CTN 5088
 GCN GCN GCN GAG AGN GCT CGC AAN CAN GCN GAC NTN GAG AAG GAG GAN 5136
 CTG GCN GAG GAG CTG GCN AGN AGC NTG TCN GGA AGG AAN NCN CTN CAG 5184
 GAN GAG AAG CGC CGC CTG GAG GCN NGG ATC GCN CAN CTN GAG GAG GAG 5232
 CTG GAG GAN GAN CAG GGC AAC ATG GAG GCN ATG AGN GAN VGN GTN CGC 5280
 AAN GCN ACN CNG CAG GCN GAG CAN CTN AGC AAN GAG CTG GCC ACA GAN 5328
 CGC AGC ACN GCN CAG AAG AAT GAG AGN NCN CGG CAN CAG CTN GAG CGN 5376
 CAG AAC AAG GAN CTN MRN AGC AAG NTN CAN GAG NTN GAN GGN GCN GTC 5424
 AAN NCC AAG NTC AAN TCC ACN NTN GCG GCG CTG GAG GCC AAG ATT GCN 5472
 CAG CTN GAG GAG CAG GTN GAN CAG GAG GCC AGA GAG AAN CAG GCG GCC 5520
 NCC AAG NCG CTG AAG CAN ANN GAC AAG AAG CTN AAG GAN NTN NTG CTG 5568
 CAG GTG GAN GAN GAG CGC AAG ATG GCN GAG CAG TAC AAG GAG CAG GCA 5616
 GAG AAA GGN AAN NCC ANG GTC AAG CAG CTN AAG AGG CAG CTG GAN GAG 5664
 GCN GAG GAG GAG TCN CAG NGC ATC AAC GCC AAC CGC AGG AAG CTG CAG 5712
 CGG GAG CTN GAN GAG GCC ACN GAG AGC AAN GAG GCC ATG GGC CGN GAG 5760

GTG AAC GCN CTC AAG AGC AAN CTC AGG VGA GGA AAC GAG NCN TCN TTN	5808
GTT CCT NCN AGA AGG NCT GGN GGN CGT AGA GTT ATT GAA AAN NCA GAT	5856
GGN TCT GAN GAN GAA NBG GAC NCT CGN GAC NCA GAC TTC AAT GGA ACC	5904
AAN NCC AGT GAA TRA	5919

請 求 の 範 囲

1. 平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAをベクターDNAに組み込んだ組換え体DNA。
2. ベクターDNAがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又は発現動物用プラスミドである請求の範囲第1項記載の組換え体DNA。
3. 発現動物用プラスミドがpCXN2又はPAGE208である請求の範囲第2項記載の組換え体DNA。
4. 平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質がヒト平滑筋型、ウサギ平滑筋型又はマウス平滑筋型である請求の範囲第1項に記載の組換え体DNA。
5. 平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAが配列番号1記載の塩基配列又は該塩基配列において1又は複数の塩基が付加、欠失又は置換されている請求の範囲第1項記載の組換え体DNA。
6. 平滑筋型ミオシン重鎖SM1アイソフォームタンパク質をコードするDNAであって、配列番号1記載の塩基配列からなるDNA又は該塩基配列において1もしくは複数の塩基が付加、欠失もしくは置換されているDNA。
7. 請求の範囲第5項記載の組換え体DNAを保持する微生物。
8. エシェリヒア属に属する請求の範囲第7項記載の微生物。
9. 請求の範囲第1項記載の組換え体DNAを含有する動脈硬化治療剤。

図 1

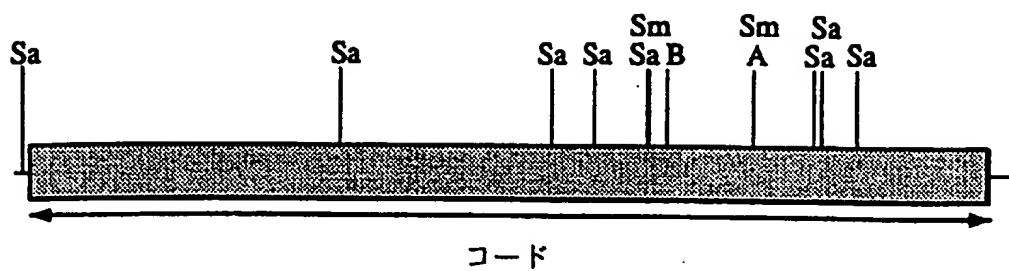


図 2

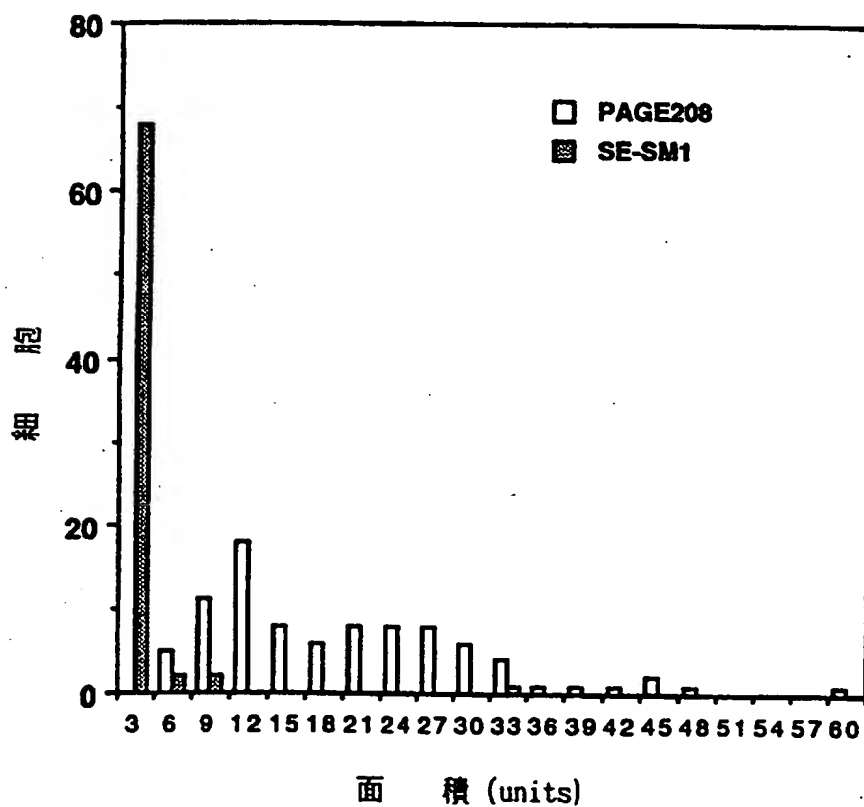


図 3

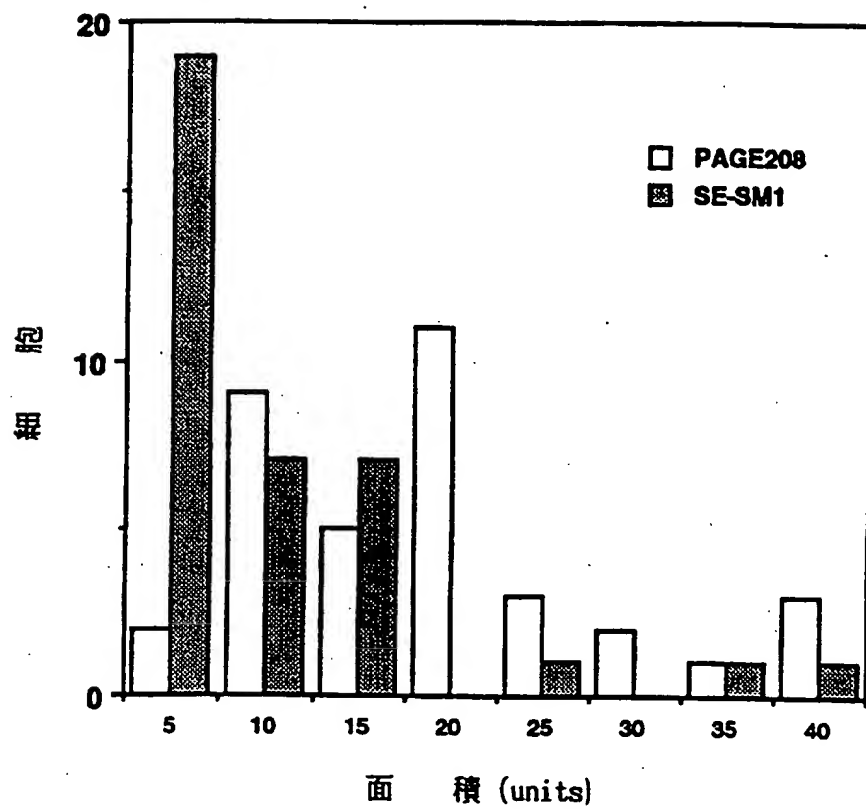


図 4

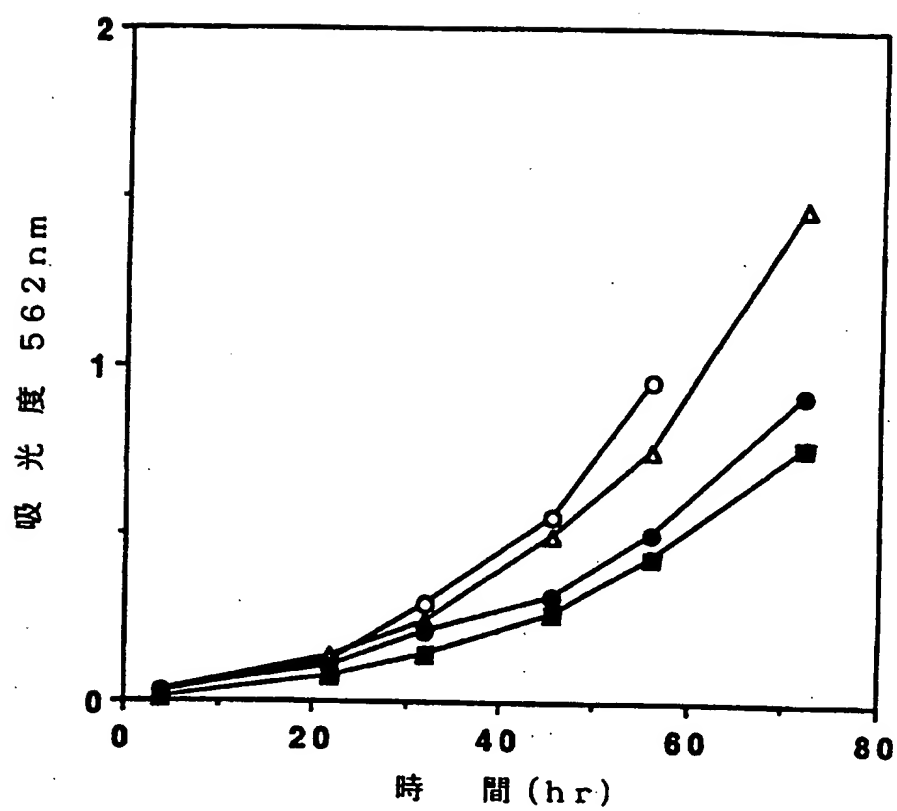
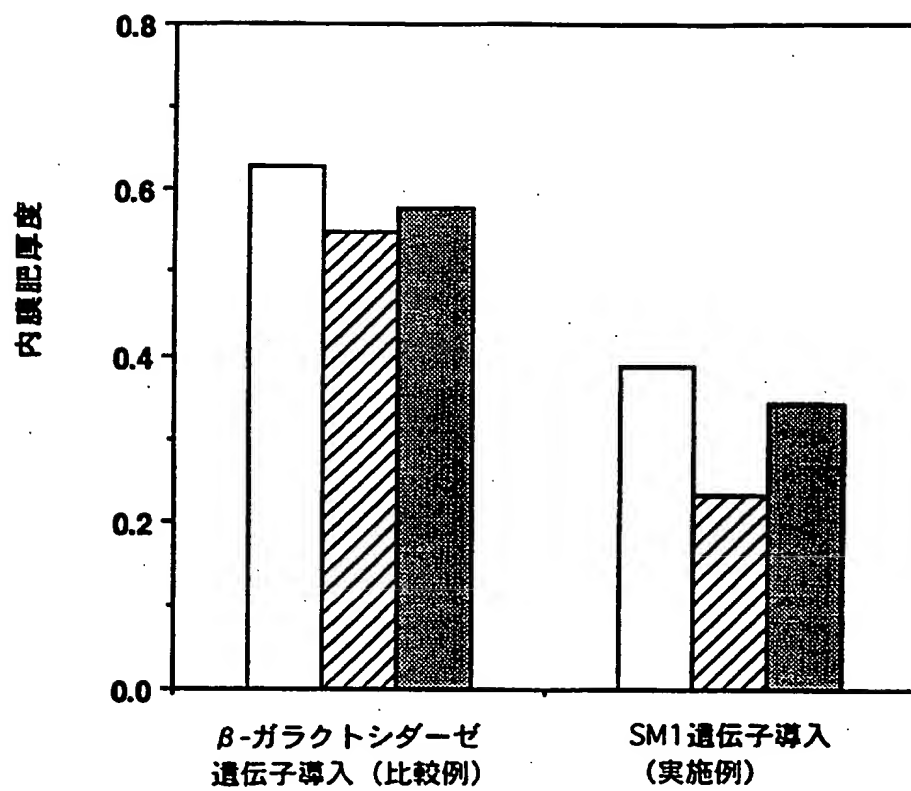


図 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/12, C12N1/21, A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/00, C12P21/00, C12N1/21, A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, CAS
MYOSIN, SMOOTH MUSCLE, HEAVY CHAIN, SM1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, p. 10676-10680 (1991)	1 - 9
X	J. Biol. Chem., Vol. 269, No. 48, P. 30538-30545 (1994)	1 - 9
X	J. Biol. Chem., Vol. 264, No. 17, P. 9734-9737 (1989)	1 - 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 11, 1996 (11. 04. 96)

Date of mailing of the international search report

April 23, 1996 (23. 04. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー
代表取締役社長 中村 寛之助
寄託者 殿
あて名 ① 194
東京都町田市旭町3丁目6番6号

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)
Escherichia coli pSE-SM1-Hyg

(受託番号)
FERM BP- 4974

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☐ 科学的性質
☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7 年 1 月 24 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、
そして、 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。
日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency for Industrial Science and Technology

所長 鈴木 修

Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 7 年 (1995) 1 月 24 日

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/12, C12N1/21, A61K38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/00, C12P21/00, C12N1/21, A61K38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, CAS
MYOSIN, SMOOTH MUSCLE, HEAVY CHAIN, SM1

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, P. 10676-10680 (1991)	1-9
X	J. Biol. Chem., Vol. 269, No. 48, P. 30538-30545 (1994)	1-9
X	J. Biol. Chem., Vol. 264, No. 17, P. 9734-9737 (1989)	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.04.96

国際調査報告の発送日

23.04.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印:

4B 9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.